ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 29, 6, 1995

УДК 595.729; 593.195; 593.192.1; 577.158.42

© 1995

ВЛИЯНИЕ ЗАРАЖЕНИЯ МИКРОСПОРИДИЕЙ NOSEMA GRYLLI И КОКЦИДИЕЙ ADELINA SP. НА АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЖИРОВОМ ТЕЛЕ СВЕРЧКОВ GRYLLUS BIMACULATUS

В. В. Долгих, М. В. Григорьев, Ю. Я. Соколова, И. В. Исси

Спектрофотометрическим методом изучено изменение активности лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27.) в жировом теле сверчков *Gryllus bimaculatus* при заражении микроспоридией *Nosema grylli* и кокцидией *Adelina* sp. У зараженных микроспоридиями сверчков наблюдается увеличение активности фермента в среднем в 5 раз по сравнению с контролем как по прямой, так и по обратной реакциям. При заражении кокцидией *Adelina* sp. активность возрастает в среднем в 10 раз. В жировом теле различных особей электрофоретически выявляется три варианта состава изоферментов лактатдегидрогеназы. Указанные варианты наблюдаются у самцов, самок и личинок последнего возраста. Все варианты обнаружены также у зараженных микроспоридиями особей. Однако мы не выявили один из вариантов (одиночную более подвижную полосу) у особей с совместной инвазией и зараженных кокцидиями сверчков. У инвазированных особей окраска изоформ в геле более интенсивна.

Сверчки *Gryllus bimaculatus* широко используются как удобная лабораторная модель в изучении физиологии насекомых. Паразитирование в клетках жирового тела этих насекомых микроспоридии *Nosema grylli* и кокцидии *Adelina* sp. позволяет использовать сверчков в качестве удобного объекта для изучения паразито-хозяинных отношений при внутриклеточном паразитизме. Наш интерес к этой модели обусловлен в первую очередь различным для микроспоридий и кокцидий характером взаимоотношений с инвазируемой клеткой (способ проникновения, развитие в прямом или опосредованном через паразитофорную вакуоль контакте с клеткой хозяина). Кроме того, отсутствие митохондрий и запасных питательных веществ у микроспоридий позволяет предположить существенные отличия в их энергетическом и углеводном метаболизме в сравнении с кокцидиями.

С нашей точки зрения, представляет интерес сравнить влияние микроспоридий и кокцидий на активность ферментов энергетического метаболизма зараженной клетки. Одним из таких ферментов является лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27.) – конечный фермент гликолиза, катализирующий обратимую реакцию превращения лактата в пируват. Соотношение активностей α-глицерофосфатдегидрогеназы и ЛДГ в различных тканях насекомых определяет состав конечных продуктов гликолиза (α-глицерофосфат, пируват, лактат) (Гилмур, 1968). Таким образом, изменение активности ЛДГ может быть связано с переключением аэробного и анаэробного путей обмена. Кроме того, наличие этого фермента у кокцидий и вероятное отсутствие аэробных процессов энергетического метаболизма у микроспоридий (в связи с отсутствием митохондрий) позволяют предположить участие ЛДГ клетки хозяина в утилизации конечных продуктов углеводного обмена паразитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили сверчки *Gryllus bimaculatus* из лабораторных популяций, поддерживаемых в инсектарии ИЭФиБ им. И. М. Сеченова. Насекомых содержали в условиях, сходных с описанными для инсектария ИЭФиБ

(Князев, 1985). Личинок второго и третьего возраста заражали микроспоридиями, добавляя в воду и на зеленый корм суспензию зрелых спор из расчета приблизительно 10^6 спор на особь. Процедуру повторяли несколько раз с недельным интервалом. Сверчков, инвазированных кокцидиями, получали из естественно зараженной популяции. Интенсивность инвазии оценивали микроскопированием препаратов жирового тела.

Отпрепарированное жировое тело промывали в 150 мМ NaCl и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком при добавлении 100 мМ трис-HCl (pH 7.8), 1 мМ PMSF. Гомогенат центрифугировали при 200 g 10 мин для удаления стадий развития паразитов. Супернатант центрифугировали при 6000 g 30 мин и надосадочную жидкость использовали для определения активности фермента. Все операции проводили при +4°. Активность определяли спектрофотометрическим методом в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 340 нм и температуре 37°. Смесь содержала: 0.15 М глициновый буфер (pH 10), 0.5 мМ НАД, 3 мМ лактат-Na для прямой реакции (превращение лактата в пируват). Контрольная смесь не содержала лактат. Смесь для реакции превращения пирувата в лактат содержала: 100 мМ K-фосфат (pH 7), 1.6 мМ пируват Na, 125 мМ НАДН, пробу фермента. Контрольная смесь не содержала пируват.

Электрофорез в 7.5 %-ном разделяющем ПААГ проводили по методу Лэмли без добавления ДСН (Laemmli, 1970). Гели окрашивали на лактатдегидрогеназу по методике Серова и Нечаева (Корочкин и др., 1977).

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование показало значительное увеличение удельной активности лактатдегидрогеназы в жировом теле сверчков при обоих типах заражения (табл. 1).

Активность ферментов увеличивается как по прямой, так и по обратной реакциям. При микроспоридиозе происходит увеличение активности ЛДГ в среднем в 5 раз по сравнению с контролем. Эти изменения отмечены при преобладании в клетках жирового тела как стадий мерогонии и ранней спорогонии, так и зрелых спор микроспоридий. У сверчков, зараженных кокцидией *Adelina* sp., активность возрастает приблизительно в 10 раз. Увеличение активности фермента зависит от интенсивности инвазии. Наиболее высокие значения активности регистрируются в случае высокоинтенсивного совместного заражения. Влияние заражения на активность ЛДГ наблюдается у самцов и самок на стадии имаго и у личинок последнего возраста.

Электрофорез изоферментов ЛДГ в ПААГ позволил выявить в жировом теле отдельных особей три варианта набора изоформ (см. рисунок). Одиночные полосы

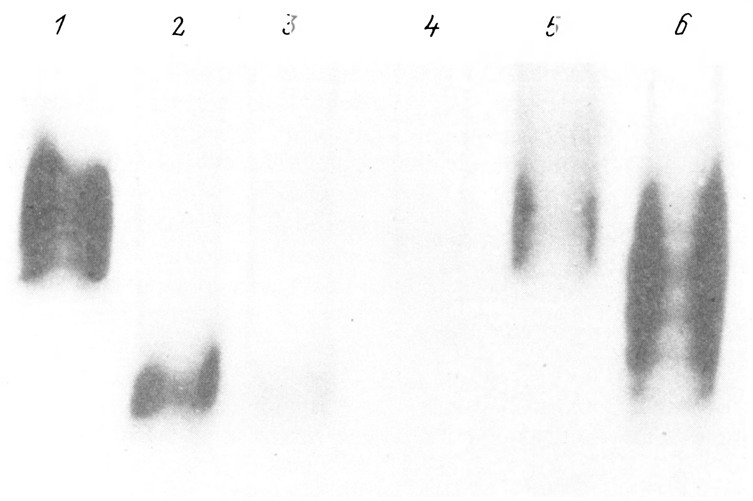
Таблица 1

Удельная активность лактатдегидрогеназы в жировом теле сверчков

Table 1. Specific activity of lactate dehydrogenase in fat body of crickets (nmole/min • mg protein)

Вариант	нмоль/мин • мг белка	
	прямая реакция	обратная реакция
Контроль	2.34 ± 0.4 (4)	2.35 ± 0.38 (14)
Заражение		
кокцидиями	25.3 ± 3.24 (8)	24.45 ± 5.02 (10)
микроспоридиями	9.9 ± 2.19 (7)	13.9 ± 4.26 (10)

Примечание. В скобках — количество независимо исследованных особей.



Изоферментный состав ЛДГ в жировом теле сверчков.

1, 2 — зараженные микроспоридиями самец и самка; *3* — два незараженных самца, объединенные в одной пробе; *4* — незараженная самка; *5* — зараженная кокцидиями самка; *6* — зараженный микроспоридиями и кокцидиями самец.

Lactate dehydrogenase isozyme patterns in cricket fat body.

с различной подвижностью, вероятно, соответствуют гомотетрамерным молекулам, образованным разными субъединицами, а пять полос – возможным сочетаниям этих субъединиц в тетрамере. При этом для полосы с меньшей подвижностью наблюдается также внутренняя гетерогенность. У самцов, самок и личинок последнего возраста отмечены все указанные варианты, что не дает оснований связать особенности изоферментного состава с полом или стадией развития хозяина. При заражении микроспоридиями также были выявлены все три варианта состава полос. Это позволяет предположить отсутствие влияния заражения на изоферментный спектр ЛДГ.

В то же время из 30 изученных сверчков, зараженных кокцидиями и с двойной инвазией, мы не обнаружили особей с более подвижной одиночной полосой (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В жировом теле тараканов *Periplaneta* и *Leucophaea*, представителей достаточно близкого к прямокрылым отряда, наблюдаются относительно низкие активности ЛДГ (Gilbert, Goldberg, 1966). Возможно, это связано с преобладанием аэроб-

Таблица 2

Изоферментный состав ЛДГ в жировом теле сверчков

Table 2. LDH isoenzymes in fat body of crickets

Вариант	Всего особей	Число особей, содержащих:		
		быструю форму	медленную форму	пять полос
Контроль	10	2	7	1
Заражение				
микроспоридиями	16	8	4	4
кокцидиями	23	0	14	9
Двойное заражение	7	0	3	4

ных процессов или с общей низкой скоростью катаболизма глюкозы. В пользу второго предположения может свидетельствовать отмечаемая авторами очень низкая активность α-глицерофосфатдегидрогеназы – фермента, способствующего переносу восстановленной формы НАД в митохондрии. В нашей работе у контрольных сверчков также выявляется низкая активность ЛДГ, что соответствует данным, полученным для других видов насекомых.

Наблюдаемое при заражении микроспоридиями и кокцидиями значительное увеличение активности фермента может быть связано с переключением метаболизма клетки на анаэробный путь обмена, например, в условиях гипоксии. С другой стороны, возможно общее усиление энергетического катаболизма в зараженной клетке с целью обеспечения процессов, необходимых для развития паразитов. Кроме того, не исключена возможность утилизации инвазированной клеткой молочной кислоты, выделяемой паразитом в качестве конечного продукта гликолиза. К сожалению, энергетический обмен микроспоридий остается почти не изученным. Показано более длительное сохранение in vitro структуры спороплазм микроспоридии *Nosema michaelis* при добавлении в среду культивирования АТФ (Weidner, Trager, 1973). Следует отметить, что повышение активности ЛДГ в 1.5–2.5 раза в кишечнике и жировом теле гусениц *Barathra brassicae* отмечалось при заражении микроспоридией *Nosema plodia* (Kucera, Weiser, 1975). У различных видов кокцидий выявлены ферменты гликолиза и цикла Кребса. Вместе с тем наличие лактатдегидрогеназы в спорозоитах и ооцистах *Eimeria stiedae* (Frandsen, Cooper, 1970) и эндозоитах *Toxoplasma gondii* (Бейер и др., 1977) свидетельствует о возможности образования молочной кислоты в качестве конечного продукта углеводного катаболизма. Так, молочная кислота является основным конечным продуктом гликолиза у внутриэритроцитарных стадий развития малярийного плазмодия (Sherman, 1979). Для дальнейшего выяснения вопросов интеграции метаболических систем паразита и клетки хозяина необходимы данные об изменении интенсивности других процессов в зараженной клетке, а также изучение особенностей энергетического обмена у самих паразитов.

Выявление в жировом теле отдельных особей описанных выше вариантов изоформ ЛДГ наводит на мысль о существовании двух генов, кодирующих фермент и по-разному экспрессирующихся в различных тканях и в неодинаковых условиях, как это имеет место у позвоночных животных. Однако, являясь тетрамерной молекулой, ЛДГ насекомых кодируется одним геном (Onoufriou, Alahiotis, 1981). В семенниках и мальпигиевых сосудах таракана *Leucophaea maderae* разделение в ПААГ выявляет только одну полосу ЛДГ. В жировом теле личинок и имаго обоих полов наряду с указанной полосой выявляется очень слабоактивная более подвижная форма (Gilbert, Golberg, 1966). Мы также выявили аналогичную форму в жировом теле сверчков. Однако она имеет подвижность, близкую к наблюдаемой у алкогольдегидрогеназы, что не позволяет уверенно идентифицировать эту форму, как ЛДГ. Существуют данные о возможности окисления лактата алкогольдегидрогеназой и этанола ЛДГ (Onoufriou, Alahiotis, 1981). На основании литературных данных можно предположить, что ЛДГ сверчков кодируется одним локусом и наблюдаемые в ряде случаев пять полос могут соответствовать комбинации в тетрамере продуктов разных аллелей одного гена. С нашей точки зрения, полученные результаты могут являться проявлением генетического полиморфизма ЛДГ в популяциях сверчков. Однако возможно существует зависимость между заражением *Adelina* sp. и генотипом сверчков, поскольку при заражении кокцидиями не выявлены особи с одиночной более подвижной полосой.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 94-04-12972).

Список литературы

Бейер Т. В., Сиим Й. Х., Хатчисон У. М. Цитохимическое исследование разных стадий жизненного цикла Toxoplasma gondii. IV. Дегидрогеназы в эндозоитах // Цитология. 1977. Т. 19, № 7. С. 813–817.

Гилмур Д. Метаболизм насекомых. М.: Мир, 1968. 230 с.

Князев А. Н. Цикл развития сверчка Gryllus bimaculatus, 1985 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтомол. обозр. 1985. Т. 64, вып. 1. С. 58–73.

Корочкин Л. И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Frandsen J. C., Cooper J. A. Some properties of L-lactate dehydrogenase from Eimeria stiedae (Protozoa: Coccidia) // Amer. Soc. Biochem. Bull. 1970. Vol. 17. P. 43.

Gilbert L., Goldberg E. Metabolic relationships in the cocroach, Leucophaea maderae. II. Electrophoretic analysis of dehydrogenase activity in tissue extracts // J. Insect. Physiol. 1966. Vol. 12. P. 53–63.

Kucera M., Weiser J. The different course of lactate and glutamate dehydrogenases activity in the larvae of Barathra brassicae (Lepidoptera) during microsporidian infection // Acta ent. bohemoslov. 1975. Vol. 72. P. 370–373.

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. 1970. Vol. 4. P. 680–685.

Onoufriou A., Alahiotis S. Enzyme specificity: „Pseudopolymorphism" of lactate dehydrogenase in Drosophila melanogaster // Biochem. Genet. 1981. Vol. 19. P. 277–299.

Sherman I. W. Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites) // Microbiological Reviews. 1979. Vol. 43. P. 453–495.

Weidner E., Trager W. Adenosine triphosphate in the extracellular survival of an intracellular parasite (Nosema michaelis, Microspori dia) // J. Cell Biology. 1973. Vol. 57. P. 586–591.

Всероссийский институт защиты растений
Санкт-Петербург–Пушкин, 189620

Поступила 15.06.1995

AN INFLUENCE OF INFECTIOSN WITH THE MICROSPORIDIA NOSEMA GRYLLI AND COCCIDIA ADELINA SP. ON AN ACTIVITY AND ISOZYME PATTERN OF LACTATE DEHYDROGENASE IN A FAT BODY OF THE CRICKET GRYLLUS BIMACULATUS

V. V. Dolgikh, M. V. Grigoryev, Yu. Ya. Sokolov, I. V. Issi

Key words: lactate dehydrogenase, cricket, fat body, microsporidia, coccidia.

SUMMARY

Crickets, beeing infected with two intracellular parasites *Nosema grylli* and *Adelina* sp., localised both in fat body cells, represent a good laboratory model for studing of host-parasite interactions. The deep physiological differences between two parasites allow to suppose the strike differences in their energetic and carbohydrate metabolism. The study of the activities of enzymes of energetic metabolism of the infected host cells contributes to understanding of the specific ways of influence of each parasite in the cell. Alterations of the lactate dehydrogenase (LDH) activities in fat body of crickets, infected with two intracellular parasites, have been studied using spectrophotometry. Infection with microsporidia caused 5-fold enhancement of LDH activity, infection with coccidia – 10-fold one. Polyacrilamid gel electrophoresis (PAGE) of supernatants from fatbody homogenates revealed three LDH isozyme patterns. After specific staining they form following bands: (1) a „slow" band; (2) a „fast" band; (3) a band with 5 distinct inner bands. These types of LDH isozyme patterns occur in studied males, females and larvae crickets, and thus the LDH variability seems not to be influenced by the sex and ontogenetic stage of hosts. Crickets, infected with microsporidia, also possess all LDH patterns, but we observed LDH isozyme pattern of type (2) neither in crickets infected with pure coccidia, nor while the mixed infection with both pathogens. The probes from infected crickets gave much more intensive stainig of isoforms. It is known that insect LDH is coded by one gene. Five bands observed may correspond to combinations of the products of different alleles of this gene inside the LDH molecule, that possesses a tetramerous structure. Our data may indicate to the existence of LDH polymorphism in cricket populations.